

## 酵母によるフェノール化合物の代謝に関する研究

著者	伊藤 昌雄
号	206
発行年	1980
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16313">http://hdl.handle.net/10097/16313</a>

氏 名 (本籍)      い      とう      まさ      お  
伊      藤      昌      雄

学 位 の 種 類      農      学      博      士

学 位 記 番 号      農      第      2 0 6      号

学位授与年月日      昭 和 5 6 年      3 月 1 2 日

学位授与の要件      学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目      酵母によるフェノール化合物の代謝に関する研究

論文審査委員      (主 査)

教授 古 坂 澄 石      教授 高 橋      甫

助教授 服 部      勉

# 論文 内 容 要 旨

## 第 1 章 緒 論

近年産業の発達に伴い、難分解性の合成化合物を含む廃水の処理が大きな社会問題となっている。その中で、製鉄工場、ガス製造工場等からのプロセス廃水は高濃度のフェノールを含み、これの完全な微生物処理は今なお大きな課題である。

フェノールを分解する微生物としては、その多くが細菌であり、酵母、カビによるものはその数も少なく、かつ低濃度フェノールに関してのものに限られていた。微生物処理の対象としての真菌は細菌に比較して沈降し易く、酸化能も強いと予想された。そこで、著者は真菌によるフェノール廃水の処理を最終目標として、スピンドル油廃水処理汚泥より分離した高濃度フェノール資化酵母 *Trichosporon cutaneum* WY 2-2 菌を主として用い、酵母によるフェノール化合物の分解に関する基礎的知見の検索につとめた。得られた結果につき、以下に述べる。

## 第 2 章 フェノール資化酵母の分離およびその性質

高濃度芳香族化合物資化性真菌の分離を目的として、スピンドル油廃液の微生物処理汚泥中よりフェノール化合物資化性酵母を分離し、同定を行った結果、無孢子酵母の *Trichosporon cutaneum* WY 2-2 と同定した。本菌は、フェノール化合物を含む種々の炭素源を利用し得るが、フェノール化合物の資化され易さが水酸基置換安息香酸、フェノール、クレゾール、ニトロフェノール、クロロフェノールの順になること、ただしいずれの化合物についても *o*-異性体は資化されないことを明らかにした。

## 第 3 章 *Trichosporon cutaneum* WY 2-2 菌のフェノール培地

### での生育特性

フェノール資化性酵母 *T. cutaneum* WY 2-2 菌のフェノール化合物分解性の基礎としてのフェノール培地における生育特性を検討した。本菌のフェノール培地での生育経過は、接種直後一時濁度の減少が認められ、濁度の低下の程度と発

育開始までの時間はフェノール濃度が高い程増大する。しかしながら、その後の生育速度、最大生育度には影響を与えなかった。このパターンは、細菌におけるトルキノン型の阻害パターンと同一である。なお、濁度の変動は生菌数を反映した。生育可能なフェノール濃度は、0.17%であったが、接種菌量によってその濃度は、影響を受けた。それらの結果の一部をFig.1に示す。

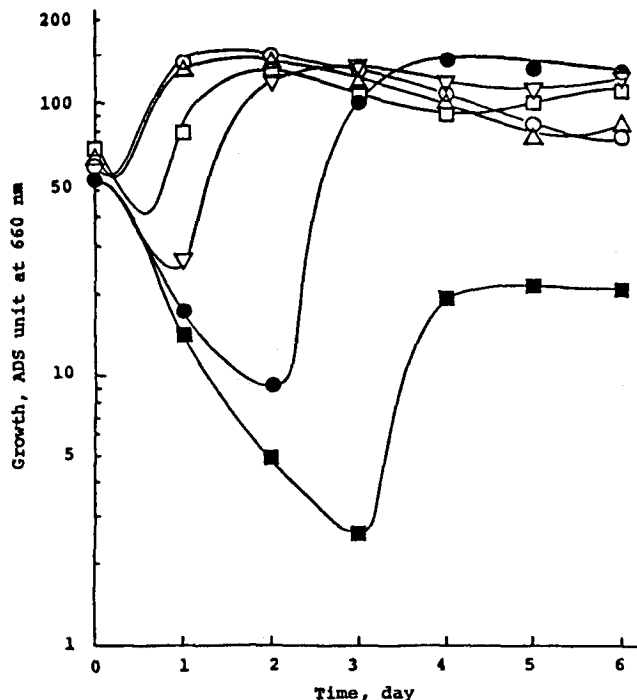


Fig. 1 Effect of inoculation on growth in media with various phenol concentrations.

Strain employed: *T. cutaneum* WY-2-2.

○ 0.09 %, △ 0.11 %, □ 0.13 %, ▽ 0.15 %, ● 0.17 %, ■ 0.19 %.

ADS unit 50:  $3.0 \times 10^7$  cells.  
" " 70:  $5.0 \times 10^7$  cells.

#### 第4章 酵母によるフェノールおよびクレゾールの代謝

本章においては、基本化合物としてフェノール、クレゾールを用いてそれらの初期酸化分解について *Trichosporon* 属と *Candida* 属の菌株を用いて検索した。その結果は、Table 1 に示すごとく、用いた菌株すべてが *o*-クレゾールを利用できず、*o*-異性体

Table 1 Utilization of Phenol and Cresols by Various Yeast Strains

Strain	<i>o</i> -Cresol		<i>m</i> -Cresol		<i>p</i> -Cresol		Phenol
	0.01%	0.05%	0.01%	0.05%	0.01%	0.05%	
	Gr (%)	Gr (%)	Gr (%)	Gr (%)	Gr (%)	Gr (%)	Gr (%)
<i>Trichosporon cutaneum</i> WY 2-2	- 6.5	++ 98.4	++ 99.5	++ 98.7	++ 99.4	++ 99.7	++ 99.7
<i>Trichosporon cutaneum</i> IFO 0116	- -	- 7.1	++ 98.6	++ 98.5	++ 98.5	++ 98.5	++ 99.5
<i>Trichosporon cutaneum</i> IFO 0173	- -	+ 13.5	++ 98.4	- 2.4	++ 98.4	++ 99.7	++ 99.7
<i>Trichosporon cutaneum</i> IFO 1198	- 1.8	+ 18.1	++ 98.6	- 5.8	++ 98.5	++ 99.4	++ 99.4
<i>Trichosporon cutaneum</i> IFO 0174	- -	- 6.2	++ 98.7	++ 72.9	++ 98.8	++ 99.6	++ 99.6
<i>Trichosporon cutaneum</i> OUT 6259	- -	- -	++ 98.7	+ 37.2	++ 98.9	++ 99.6	++ 99.6
<i>Trichosporon cutaneum</i> OUT 6306	- -	- 6.0	++ 98.7	- -	++ 98.4	++ 99.7	++ 99.7
<i>Trichosporon cutaneum</i> OUT 6307	- -	- -	++ 99.2	- 5.1	++ 99.0	++ 99.7	++ 99.7
<i>Trichosporon cutaneum</i> OUT 6308	- 4.5	- 4.7	++ 99.2	- 5.2	++ 99.2	++ 99.7	++ 99.7
<i>Trichosporon cutaneum</i> OUT 6327	- 4.3	+ 53.5	++ 99.2	++ 98.9	++ 99.0	++ 99.4	++ 99.4
<i>Trichosporon infestans</i> IFO 1200	- 8.7	± 11.5	++ 98.9	± 12.2	+ 43.7	++ 99.3	++ 99.3
<i>Trichosporon capitatum</i> IFO 1197	- 3.5	- 7.3	++ 98.0	± 10.7	- 0.7	++ 98.8	++ 98.8
<i>Trichosporon capitatum</i> IFO 0743	± 11.5	± 10.8	++ 97.8	± 11.3	+ 56.1	++ 99.1	++ 99.1
<i>Candida albicans</i>	- 1.7	- 7.7	++ 98.4	- 7.3	++ 82.3	++ 99.3	++ 99.3
<i>Candida utilis</i> IFO 4264	- 1.7	- 6.3	++ 98.9	- 6.6	+ 34.8	- 7.4	- 7.4
<i>Candida utilis</i> IFO 0988	- 3.5	- 5.6	++ 99.7	- 6.8	++ 88.5	- -	- -
<i>Candida tropicalis</i>	- -	- -	+ 42.2	- -	± 10.2	++ 99.6	++ 99.6
<i>Candida lipolytica</i> IFO 1209	- 3.5	- 3.5	++ 98.7	- 5.1	++ 82.2	- -	- -
<i>Candida lipolytica</i> IFO 1195	- 4.3	- 2.5	++ 99.1	- 2.1	++ 98.5	± 9.1	± 9.1
<i>Rhodotorula</i> sp.	- 7.0	- 6.7	++ 99.0	- 6.8	++ 77.4	+ 32.0	+ 32.0

Gr, Growth of 5th day. ++, Abundant growth; +, Moderate growth; ±, Poor growth; -, No growth. %, Ratio of substrate consumption. IFO, Institute for Fermentation, Osaka; OUT, Faculty of Technology, Osaka University. Shake culture at 30°C. Yeast strains were cultured as in Table 1. Phenol and cresols were determined by the method of Folin et al.<sup>(10)</sup>

を資化し得ない性質がこれら酵母にとってかなり普遍的なものであることを示した。

ついで、*T. cutaneum* WY 2-2 菌を用いてフェノール分解の初期酸化について検索し、フェノールの水酸化によってカテコールが生成し、これが intradiol 型のオルソ開裂によって *cis, cis*-ムコン酸となり、コハク酸とアセチル CoA から TCA サイクルに入る経路を推定

した。また、WY 2-2 菌を

含む *Trichosporon* 属酵母 5

株および *Candida* 属 1 株を

用いてそのジオキシゲナー

ゼの核開裂型を検索し、

Table 2 に示すごとく、用

いた菌株すべてが intradi-

ol 型のオルソ開裂に参与す

る酵素を有すること、およ

びその基質特異性より、カテコールよりも 4-メチルカテコールに強い親和性を示すタイプと、カテコールにもっとも強い活性を

示すタイプの 2 群に大別されることを示した。

*p*-あるいは *m*-クレゾール培養物の汙液

中に、その水酸化生成物である 4-メチルカ

テコールの存在が確認された。次いで、4-

メチルカテコールの核開裂産物が 3-メチル

ムコン酸であることを、TLC、UV 吸収スペ

クトル、ガスマススペクトル等より同定した

。Fig. 2 にガスマスの結果を示した。*p*-ク

レゾール、*m*-クレゾール、*m*-クレゾール

と *o*-クレゾールの混合物、フェノールと、各生育基質あるいは生育基質と非生

Table 2 Dioxygenase activity in crude extracts of several yeasts.

Strain	Oxygenase activity (%)			
	Substrate			
	Catech	4-MeCa	3-MeCa	Pyroga
<i>Trichosporon cutaneum</i> WY 2-2	100*	146	4	3
<i>T. cutaneum</i> IFO 0116	100*	121	7	15
<i>T. infestans</i> IFO 1200	100*	173	3	4
<i>T. cutaneum</i> OUT 6307	100*	50	7	ND
<i>T. capitatum</i> IFO 1197	100*	32	1	2
<i>Candida albicans</i>	100†	17	1	1

Each strain was harvested from shake cultures on a 0.05% phenol medium. Oxygenase activity was determined spectrophotometrically by the increase in absorbance at 260 nm except pyrogallol at 300 nm, or manometrically by the rate of oxygen uptake where one enzyme unit was defined as the amount of enzyme catalyzing the uptake of 1  $\mu$ mole of oxygen per min.

The manometric assay system contained in a volume of 2 ml: phosphate buffer, pH 7.0, 100  $\mu$ mole; substrate, 2  $\mu$ mole; extract, 1 ml (approx. 2-3 mg of protein); 20% KOH in the centre well, 0.2 ml. Incubation at 30°C.

\* Corresponding to 0.164 units/mg of protein. \* Corresponding to 0.052 units/mg of protein. \* Corresponding to 0.061 units/mg of protein. \* Corresponding to 0.357  $\mu$ mole. O<sub>2</sub>/min. \* Corresponding to 0.283 units/mg of protein. † Corresponding to 0.329 units/mg of protein.

Catech: Catechol. 4-MeCa: 4-Methylcatechol. 3-MeCa: 3-Methylcatechol. Pyroga: Pyrogallol. ND: Not determined.

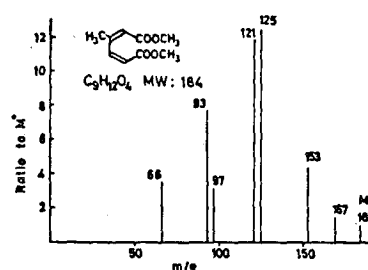


Fig. 2 Mass spectrum of methyl ester of the reaction product of 4-methylcatechol. The mass spectrum was determined on a JMS-D100 double focusing spectrometer with a JGC-20K gas chromatograph operating at 25 e. v.

育基質の共存条件によって得られた菌体からのオキシゲナーゼ活性は、Table 3 に示すごとくその基質に関係なくすべてカテコール 1,2-オキシゲナーゼ活性を示し、かつその基質特異性が 4-メチルカテコールに高い親和性を示すことおよび他の基質に対する活性が全く同じ傾向を示すことから、本菌におけるフェノール、クレゾールの環開裂反応には、同一のカテコール 1,2-オキシゲナーゼが関与することを示唆した。以上、本菌のクレゾール分解系は、最初に核の直接の水酸化の結果 4-メチルカテコールが生成し、これがオルソ開裂型のオキシゲナーゼによって 3-メチルムコン酸となり、以後細菌で明らかとなった経路と同様に代謝されると推定した。

Table 3 Dioxygenase activity in crude extracts of *T. cutaneum* WY 2-2.

Substrate	Oxygenase activity (units/mg of protein)			
	Growth substrate			
	Phenol (0.1%)	<i>p</i> -Cresol (0.04%)	<i>m</i> -Cresol (0.04%)	<i>m</i> -Cresol (0.03%) ** <i>o</i> -Cresol (0.01%)
Catechol	1.641 (100)	0.093 (100)	0.914 (100)	0.813 (100)
4-Methylcatechol	2.355 (144)	0.164 (176)	1.550 (170)	1.357 (167)
3-Methylcatechol	0.058 (4)	0.002 (2)	0.028 (3)	0.029 (4)
Pyrogallol	0.048 (3)	—	0.050 (5)	0.048 (6)

The cells were harvested from shake cultures on media containing phenol, *p*-cresol, *m*-cresol, or *m*-cresol and *o*-cresol, washed twice with 0.1 M Tris-HCl buffer containing 5 mM 2-mercaptoethanol and 10  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>, pH 8.0 (4°C) and disrupted in a Braun cell homogenizer at 4,000 rpm for 60 sec. The resulting homogenates were centrifuged at 30,000 $\times g$  for 20 min and treated with protamine sulphate. With the supernatant obtained, catechol-1,2-oxygenase activity was determined spectrophotometrically by the increase in absorbance at 260 nm except pyrogallol at 300 nm. Each cuvette contained in a final volume of 1 ml: 50  $\mu$ moles of Tris-HCl buffer, pH 7.5; 0.1  $\mu$ mole of substrate; crude extracts, 0.1 ml (approx. 200–300  $\mu$ g of protein). Protein was determined by the biuret method.<sup>(10)</sup>

One enzyme unit is defined as the amount of enzyme catalyzing the formation of 1  $\mu$ mole of the respective product expected (catechol to *cis,cis*-muconic acid, 4-methylcatechol to 3-methylmuconic acid, 3-methylcatechol to 2-methylmuconic acid and pyrogallol to 2-hydroxymuconic acid) per min. Specific activity is calculated as enzyme units per mg of protein.

Figures in parentheses are the percentages of the activity towards catechol.

\*\* Strain WY 2-2 cannot utilize *o*-cresol as a sole source of carbon but the cells of this strain can oxidize *o*-cresol.

## 第 5 章 カテコール 1,2-オキシゲナーゼの精製およびその性質

前章において、本菌のカテコールオキシゲナーゼが既知の酵母カテコールオキシゲナーゼと異なることが推定されたので、これの精製および諸性質の検討を試みた。精製のための菌体収得法として、ミニジャーによる菌体の高濃度仕込みによる基質の逐次添加でもって、短時間で分解力の強い菌体を高収率で得た。本菌の粗酵素液は、pH7.6 以上 8.3 までは安定であり、かつ 10%エタノールおよび 5mMメルカプトエタノールの添加によりその安定性が向上した。よって以後 10% エタノール、5mM メルカプトエタノール、4 $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> を含むトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8~8.0, 4°C) 中で精製を行い最終的に約 210 倍に精製した。その結果を Table 4 にまとめた。本酵素の基質特

異性は  
、粗酵  
素液で  
のそれ  
と変ら  
ず、カ  
テコー  
ル、4

Table 4 Purification of catechol 1,2-oxygenase from *T. cutaneum* WY2-2 grown on phenol

Step No.	Enzyme in	Volume ml	Proteins mg/ml	Specific activity units/mg	Total proteins mg	Total activity units	Purification -fold	Yield %
1	Crude extract	557.0	1.4	0.85	756.5	643.0	1.0	100
2	Protamine treated supernatant	562.0	1.0	1.33	576.7	767.0	1.6	119
3	Ammonium sulphate precipitate 45 to 75 %	58.3	2.6	7.46	151.6	1130.9	8.8	176
4	DEAE Sephacel treated enzyme	25.0	1.6	19.6	40.0	784.0	23.1	122
5	Sephadex G-200 passed enzyme	10.0	0.33	129.9	3.3	428.6	152.8	67
6	Eluate from a hydroxy-apatite column	8.0	0.12	181.5	0.96	174.2	213.5	27

ーメチルカテコール、ヒドロキシキノールに高い親和性を示した (Table 5)。分子量は、SDS、100℃ 5分処理の酵素で約 35,000, native な酵素で約 105,000を示し、サブユニット3個からなる蛋白質であることを示唆した。昇汞、pCMB,  $\alpha, \alpha'$ -ジピリジルでの強い阻害は、本酵素がSH-酵素であり、かつ2価鉄を含む酵素であることを示唆する。

Table 5 Substrate specificity of purified catechol 1,2-oxygenase from *T. cutaneum* WY 2-2

Substrate	Specific activity	
	U/mg of protein	%
Catechol	4.784	100.0
4-Methylcatechol	7.020	146.7
3-Methylcatechol	0.314	6.6
Hydroxyquinol	7.608	159.0
Pyrogallol	0.353	7.4

All values were corrected for spontaneous oxidation of the substrates.  
Spectrophotometric assay.

## 第6章 酵母による *p*-および *m*-ヒドロキシ安息香酸の代謝

本章においては、フェノール、クレゾール以外のもう一つの基本化合物としてのヒドロキシ安息香酸の分解について検索した。0.05% *p*-ヒドロキシ安息香酸培地で最初の代謝産物と推定されるプロトカテキン酸の蓄積条件を検討し、振とう4時間後静置という通気制限培養で、0.4mMと最大蓄積を示し、それ以後もそのレベルを維持することを見だし、この条件を用いて生成代謝産物を分離し、プロトカテキン酸と同定した。*p*-および *m*-ヒドロキシ安息香酸生育菌体からの粗酵素液を用いてその水酸化酵素活性を測定し、Table 6に示すごとく、NADPH要求性の *p*-および *m*-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素と、NAD(P)H要求性

プロトカテキン酸水

酸化酵素の少くとも

3種類の酵素の存在

を示唆した。プロト

カテキン酸、カテコ

ールの酸素吸収実験

から、プロトカテキ

ン酸が脱炭酸されて

カテコールとなる経路は否定さ

れ (Table 7)、ヒドロキシキノ

ールに対する核開裂酵素活性の

強さ (Table 8)、0.6 モルの炭

酸ガス放出 (Table 7)、開裂産

物と推定されるマレイル酢酸に

一致する UVスペクトル等よりプ

ロトカテキ

ン酸の水酸

化生成物が

ヒドロキシ

キノールであ

ることを推

定した。ヒ

ドロキシキノール開裂酵素は、Table 8に見られるごとく、先に述べたカテコ

ール 1,2-オキシゲナーゼとはその基質特異性において明らかに異なり、ヒドロキ

シキノールオキシゲナーゼと呼ばれるべきであると考ええる。

Table 6 Hydroxylase activities in crude extracts from yeast strains grown on p- or m-hydroxybenzoate

Substrate	Cofactor	Specific activities ( $\mu\text{mol/min/mg}$ of protein)		
		m-OHBA-grown	p-OHBA-grown	T. infestans
		WY 2-2	WY 2-2	
p-Hydroxybenzoate	NADH	0.016 ( 28.6)	0.014 ( 8.0)	—
	NADPH	0.076 (135.7)	0.175 (100.0)	0.066 (100.0)
m-Hydroxybenzoate	NADH	0.005 ( 8.9)	0.001 ( 0.6)	—
	NADPH	0.056 (100.0)	0.001 ( 0.6)	—
o-Hydroxybenzoate	NADH	0.005 ( 8.9)	—	—
	NADPH	—	0	—
Protocatechuate	NADH	0.358 (639.3)	0.207 (118.3)	—
	NADPH	0.157 (280.3)	0.101 ( 57.7)	0.020 ( 30.3)
$\beta$ -Resorcyate	NADH	0.103 (183.9)	—	—
	NADPH	0.019 ( 33.9)	0.070 ( 40.0)	—
Gentisate	NADH	0.011 ( 19.3)	—	—
	NADPH	0.019 ( 33.9)	0.057 ( 32.6)	0.020 ( 30.3)
Phenol	NADH	0.011 ( 19.3)	—	—
	NADPH	0.007 ( 12.5)	—	—
Resorcinol	NADH	0.011 ( 19.3)	—	—
	NADPH	0.004 ( 7.1)	—	—

Table 7 Oxidation of some substrates by a crude extract of *T. cutaneum* WY2-2 grown on p-hydroxybenzoate.

Substrate	O <sub>2</sub> uptake mol.O <sub>2</sub> /mol.Subst.	CO <sub>2</sub> evolved mol.CO <sub>2</sub> /mol.Subst.
p-Hydroxybenzoate	3.10	0.78
m-Hydroxybenzoate	0	—
Protocatechuate	1.99	0.61
Catechol	0.82	0.2

Warburg flasks contained : phosphate buffer(pH7.6) containing 10% ethanol, 100  $\mu\text{moles}$ ; substrates, 2  $\mu\text{moles}$ ; extract, 0.5 ml containing a total of 3.3 mg of enzyme protein. The final volume was adjusted to 2.0 ml with water. Flasks were incubated at 30°.

Table 8 Oxidation of various catechols by crude extracts from *T. cutaneum* WY2-2 grown on p- or m-OHBA

Substrate	Specific activity grown on			O <sub>2</sub> uptake mol.O <sub>2</sub> /mol. Substrate
	p-OHBA	m-OHBA		
		Expt. 1	Expt. 2	
Hydroxyquinol	0.107 (100.0)	0.207 (100.0)	0.089 (100.0)	0.98
Catechol	0.002 ( 1.9)	0.005 ( 2.4)	0.006 ( 6.7)	0.89
3-Methylcatechol	N.T.	N.T.	0.005 ( 5.6)	—
4-Methylcatechol	N.T.	N.T.	0.002 ( 2.2)	0.98
3-Carboxycatechol	N.T.	N.T.	0.008 ( 9.0)	1.12

Pyrogallol and 4-nitrocatechol were not oxidized. N.T. : Not tested.

Figures in parentheses are percentages of activity to hydroxyquinol.



## 第7章 結 論

以上に述べたごとく、フェノール廃水の微生物処理を最終目標として、酵母によるフェノール化合物の分解に関する基礎的知見の検索につとめた。

すなわち、高濃度フェノール資化性酵母1株を分離し、*Trichosporon cutaneum* WY2-2と同定した。本菌を含む *Trichosporon* 属酵母は、種々のフェノール化合物資化能を有するものの、それらの*o*-異性体は利用し得ないことを示し、この性質がこれら酵母にとって普遍的であることを示唆した。また、フェノール培地における本菌の生育特性についても検討した。

WY2-2菌を含む *Trichosporon* 属酵母のフェノール、クレゾール、ヒドロキシ安息香酸の分解系について検索し、Fig. 3に示すごとく、フェノールはカテコール、*cis,cis*-ムコン酸(9)を経てコハク酸とアセチル CoAに至る経路、クレゾールは4-メチルカテコール(7)、3-メチルムコン酸(10)を経てTCA サイクルに入る経路で分解されることを推定した。

WY2-2菌におけるフェノールとクレゾールの核開裂は、同一のカテコール1,2-オキシゲナーゼ関与の反応であることが示唆され、調べた限りでは、すべての酵母が *intradiol* 型のオルソ開裂様式酵素を有すること、その基質特異性より2種に大別されることを示唆した。

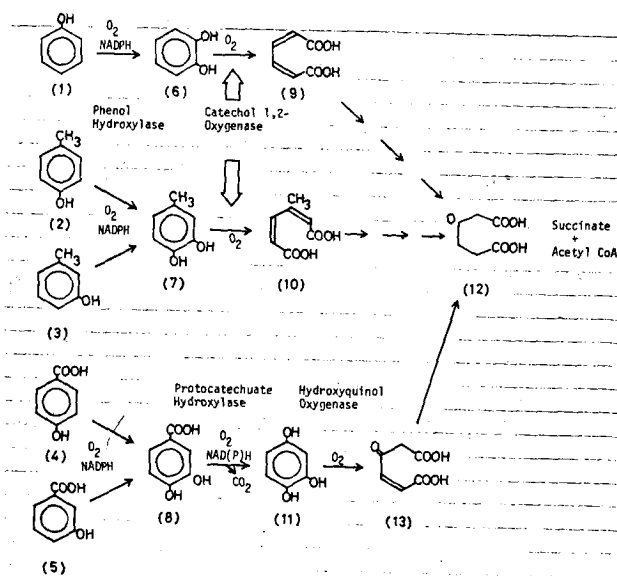


Fig. 3 Proposed reaction sequence for the degradation of phenolic compounds by *T. cutaneum* WY 2-2.  
(1) Phenol, (2) p-Cresol, (3) m-Cresol, (4) p-Hydroxybenzoate, (5) m-Hydroxybenzoate, (6) Catechol, (7) 4-Methylcatechol, (8) Protocatechuic acid, (9) cis,cis-Muconate, (10) 3-Methylmuconate, (11) Hydroxyquinol, (12)  $\beta$ -Ketodipate, (13) Maleylacetate.

基質特異性に特徴のあったWY2-2菌のカテコールオキシゲナーゼを約210倍に精製した。本酵素は、分子量約105,000、SDS処理酵素はその分子量35,000を示し、サブユニット3個よりなる蛋白質であることを示唆した。その基質特異性は、粗酵素液と変わらず、カテコール、4-メチルカテコール、ヒドロキシキノールに高い活性を示した。また阻害剤実験より、本酵素は鉄を含み、かつSH-酵素であることを示唆した。

ヒドロキシ安息香酸の代謝経路については、Fig.3に示すごとく、プロトカテキン酸(8)が脱炭酸されてカテコールとなる経路は否定され、ヒドロキシキノール(11)を経てマレイル酢酸(13)に核開裂されることを明らかにした。

## 審 査 結 果 の 要 旨

フェノール化合物の微生物による分解は、これを含む廃水浄化技術の基礎として重要である。

著者はこのことを前提として、スピンドル油廃水処理汚泥より、フェノール資化性酵母を分離し、*Trichosporon Cutaneum*と同定した。該菌はこれ迄に知られているフェノール資化性微生物に較べ遙かに高い濃度のフェノール存在下でこれを資化し得る特性をもっている。そして、該菌を含む*Trichosporon* 属酵母は、種々のフェノール化合物を資化して増殖しうる、オルソ異性体は利用し得なかった。

著者は該菌を主に使用しながら *Trichosporon* 属酵母のフェノール、クレゾール、ヒドロキシ安息香酸の分解系（特に初期段階）について検索し、フェノールはカテユール、*cis-cis*- $\mu$ コン酸を経てコハク酸とアセチル CoA に至る経路、クレゾールは 4-メチルカテコール、3-メチル $\mu$ コン酸を経て TCA サイクルに入る経路、ヒドロキシ安息香酸はヒドロキシキノールを経てマレイル酢酸に核開裂される経路を経ることを明らかにした。

更に進んで、該菌のフェノールおよびカテコールの核開裂は同一のカテコール 1, 2-オキシゲナーゼが関与する反応であることから、該酵素について精査した。その結果、調査したすべての酵母が *intradiol* 型のオルソ開裂様式酵素を有すること、およびその基質特異性より 2 群に大別されることを示唆した。また、基質特異性に特徴のあった前記分離菌のカテコールオキシゲナーゼを約 210 倍に精製し、この酵素の特性を精査した本酵素は分子量約 105,000、SDS 処理酵素の分子量は 35,000 でサブユニット 3 ケよりなる蛋白質であることが示唆された。その基質特異性はカテユール、4-メチルカテコール、ヒドロキシキノールに高い活性を示した。また、阻害実験より本酵素は鉄を含み、SH 酵素であることを示唆した。